

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07774

研究課題名(和文) 絶滅危惧種アポイカンバの保全に資する菌根菌の探索

研究課題名(英文) Search for ectomycorrhizal fungi contributing to the conservation of the endangered species *Betula apoiensis*

研究代表者

村田 政穂 (Murata, Masao)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：20582381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アポイカンバは、北海道のアポイ岳周辺にのみに生息する絶滅危惧種の樹木である。本研究は、アポイカンバと共生する外生菌根菌を明らかにするため、アポイカンバ林分の成木の菌根と土壤中の埋土胞子の種組成を調査した。その結果、アポイカンバの成木の菌根菌はフウセンタケ科やセイヨウシヨウロ科、イグチ科の菌が高頻度で検出された。一方、埋土胞子は種数と出現頻度が著しく低く、アポイカンバの更新時の実生苗ではほとんど利用されていないことが考えられた。したがって、アポイカンバの実生は「菌根菌ネットワーク」を利用することだけで更新が可能であることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者はこれまでに絶滅危惧種であるトガサワラやヤクタネゴヨウの菌根菌群集を安定時と攪乱時の感染源の両面から明らかにし、攪乱時の菌根菌の感染源が両樹種の実生の生育を助けることを発見した。本研究では広葉樹であるアポイカンバでも同様の研究を行ったところ、これまでの樹種とは異なったパターンを示し、安定時の感染源のみが実生の生育を助ける結果となった。本研究から得られた結果は、菌根菌を利用した絶滅危惧樹木の保全手法は、対象樹種の実生の感染源によって変える必要性が示され、今後世界各地で衰退や絶滅が危惧される同様の樹木にも応用する意味で非常に意義のあるものとなった。

研究成果の概要(英文)：*Betula apoiensis* is an endangered tree that only inhabits Mt. Apoi in Hokkaido. In this study, in order to clarify the ectomycorrhizal fungi (EMF) that infect *B. apoiensis*, the species composition of EMF on soil spore banks and mature trees in the *B. apoiensis* stand was investigated. As a result, the EMF of mature trees of *B. apoiensis* were frequently detected at Cortinariaceae, Tuberaceae, and Boletaceae. On the other hand, the number of species and frequency of EMF on the soil spore banks are extremely low. Therefore, these results suggested that the regeneration of *B. apoiensis* not depend on soil spore banks but depend on mycelial networks at mature tree.

研究分野：森林保護学

キーワード：絶滅危惧種 外生菌根菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

すでに成立した森林には多様な菌根菌が生息し、一つの樹種に 100 種を超える菌種が共生することも珍しくない。ただし、特定の樹木にしか共生しない菌種も多く、菌種によって樹木に与える影響は大きく異なる。そのため、対象となる樹木にどのような菌根菌がどれくらい共生しているのかを明らかにすることは、菌根菌を活用した樹木の保全と保護にむけた最初のステップとして重要であると考えた。モデルケースとして、申請者はまず絶滅危惧種のトガサワラ (*Pseudotsuga japonica*) の菌根菌相を解明する研究を行い、トガサワラに特異的な菌根菌の発見し、その菌が実生の生育に関与していることを示す一定の成果を得た(村田・奈良 2017; Murata et al. 2013; 2017a)。さらにヤクタネゴヨウでも同様の成果を得た (Murata et al. 2017b)。本研究課題では、これまで針葉樹で見られた研究成果が広葉樹にも適用できるのかどうかを検証するため、絶滅危惧種のアポイカンバ(*Betula apoensis*)をさらなるモデルケースとして、菌根菌相の解明を試みた。

アポイカンバは日本固有のカバノキ科の広葉樹で、北海道アポイ岳にのみ生育が確認されている。現存している個体数は 4.3ha に約 2,300 個体となっており、絶滅危惧 IA 類(CR)に指定されている。2008 年にユネスコが支援するジオパークにアポイ岳が認定され、アポイカンバの残存林分もその区域に入っている。減少の直接的な要因は、高山植生の遷移やハイマツ帯の拡大であるが、更新個体が少ないことも減少原因の一つとされる。

2. 研究の目的

本研究課題では、成木に共生する菌根菌相の解明だけではなく、アポイカンバ実生にどのような菌根菌が感染し、それぞれの菌根菌によって実生の成長がどの程度促進されるのかについても明らかにすることを目的とした。アポイカンバ林分には、ハイマツも自生するため、ハイマツの菌根菌相とアポイカンバの菌根菌相を比較することで、アポイカンバにだけ出現する菌根菌の存在を明らかにすることも試みた。さらに、アポイカンバは陽樹であり、実生の更新には大規模な攪乱が必要となることが想定される。こうした攪乱条件下では周囲の生きた成木が激減し、安定時の感染源の利用ができなくなる。そのため、土壌中に休眠状態で存在する菌根菌の胞子が実生への主要な感染源となる。そこで、バイオアッセイという手法を用いて現地から採取した土壌でアポイカンバ実生を育苗し、埋土胞子から菌根菌を感染させることで、埋土胞子の種構成を明らかにした。

3. 研究の方法

調査は北海道様似町アポイ岳の 7 ~ 8 合目のアポイカンバ・ハイマツ林分で行った。アポイカンバ成木の周囲において土壌サンプル (5×5×10cm) を 50 ケ所 (北側斜面 14 ケ所、南側斜面 36 ケ所) で 2 つずつ採取した。各サンプリング地点は独立性を確保するため約 5 m 以上離し、それぞれの位置を GPS で記録した。2 つの土壌ブロックのうちの 1 つは林分内の成木の菌根菌群集を明らかにするために、もう 1 つは埋土胞子を調べるためのバイオアッセイ試験に供した。持ち帰ったサンプルは処理するまでの間冷蔵保管した。

成木の菌根菌群集を明らかにするために各サンプルから根を洗い出し、実体顕微鏡下で菌根の形態類別を行った。各サンプル中の全ての菌根形態タイプから DNA 解析用の菌根端サンプルを複数選び、あらかじめ CTAB を入れたチューブに入れて保存し、CTAB 法によって DNA を抽出した。菌特異的プライマー (ITS1F または ITS0F-T と ITS4 または LB-W, ITS4B) によって、rDNA の ITS (internal transcribed spacer) 領域を増幅した後、ダイレクトシーケンスを行ない、既存の塩基配列データベース (GenBank など) で相同性検索して菌根菌の種同定を行った。さらに、上記の試験の DNA 抽出サンプルより、葉緑体 DNA (trnL-F 領域と rbcL 領域) を増幅し、シーケンスによる同定結果と毎木調査の結果より宿主樹種を特定した (Tedersoo et al. 2008)。

埋土胞子を調べるバイオアッセイ用の土壌試料からは粗大有機物を取り除いて約 4 ヶ月常温で風乾させた。50 ml チューブに風乾土壌を入れ、アポイカンバやハイマツの種子を植えて約 6 ヶ月間育苗した。また、本手法で育苗したアポイカンバがすべて枯死してしまったため、滅菌した市販土壌で栽培した苗 (アポイカンバとヒメコマツ) に、各風乾土壌の懸濁液を接種するバイオアッセイも行った。各乾燥土壌 100g と蒸留水 100 ml を混ぜて攪拌し、土壌中の埋土胞子を懸濁したのち、250 μm メッシュ布で土壌残渣を濾過除去して埋土胞子接種源とした。

データの解析は得られた菌根菌の種の出現頻度から、生息する全菌種数を Estimate S によって推定した。また、菌根菌群集を樹種ごとに分けて多変量解析 (NMDS) し、菌根菌の種構成におよぼす樹種や採取地の影響を評価するとともに、アポイカンバに特異的な菌種の有無を明らかにした。

4. 研究成果

アポイカンバ・ハイマツ林から採取した土壌中で見つかった菌根を実体顕微鏡下で観察し、このうち 610 の DNA サンプルを DNA 解析に用い、シーケンスを行った。その結果 103 種の菌根菌が検出され、アポイカンバだけでも 88 種の菌根菌が検出された。Estimate S による推定菌根菌種数は林分全体では 208 種、アポイカンバだけでは 159 種以上であった。

検出された菌根菌群集は数種の複数頻度で出現した菌種と大多数の1つの土壤サンプルにしか出現しなかった菌種で構成されていた。これは菌根菌の典型的な群集構造であった。

Cenococcum geophilum が最も高頻度で出現し、ベニタケ科 (Russulaceae) やイボタケ科 (Thelephoraceae)、カレエダタケ科 (Clavulinaceae) も高頻度で出現した (図1)。

Cenococcum geophilum やベニタケ科、イボタケ科はすべての外生菌根性宿主樹木で検出された。一方で、ヌメリイグチ科 (Suillaceae) とシヨウロ科 (Rhizopogonaceae) はハイマツでのみ検出され、フウセンタケ科 (Cortinariaceae) やセイヨウシヨウロ科 (Tuberaceae)、イグチ科 (Boletaceae)、アセタケ科 (Inocybaceae) はハイマツ以外の宿主でのみ検出された。NMDSによる多変量解析によって、菌根菌群集は宿主樹木と採取林分で異なる傾向が

示された (図2, Stress=0.092)。PerMANOVAでも菌根菌群集は宿主樹木間と斜面間で有意に異なっていた ($P < 0.05$)。これらの結果から、ハイマツの侵食がさらに進めば、菌根菌相も変化し、さらにアポイカンバの更新が難しい環境になる可能性が示唆された。

菌根菌の埋土孢子群集を調べるバイオアッセイの結果は、いずれの樹種でも菌根の形成された苗の頻度は低く (アポイカンバ: 28%、ハイマツ: 35%、ヒメコマツ: 32%)、埋土孢子の存在量は一般的な森林よりも少ないことが示唆された。形成された菌根の菌種を同定したところ、アポイカンバで優占していた菌種は、Pyronemataceae sp.1 だった。

一方、ハイマツやヒメコマツでは *Cenococcum geophilum* (ハイマツのみで検出) や *Rhizopogon* sp.1、*Rhizopogon nitidus* が優占した (図3)。アポイカンバは成木と埋土孢子で共通種がなかったが、ハイマツはほとんどが共通種 (6種中5種) だった (図4)。通常のバイオアッセイではすべてのアポイカンバは枯死したことから、孢子懸濁液接種のバイオアッセイでも菌根の形成頻度が低かったことから、アポイカンバの更新に埋土孢子的利用は難しいことが考えられた。富士山火山荒原のミヤマヤナギでは埋土孢子的存在していない場所での実生の更新は困難であり、周辺の成木に感染した菌根菌からのびる菌糸を感染源とした「菌根菌ネットワーク」の存在がミヤマヤナギの更新には必要不可欠であることが指摘されている (Nara and Hogetsu 2004)。アポイカンバにおいても同様に、更新には菌根菌ネットワークが必要であることが考えられた。したがって、このまま八

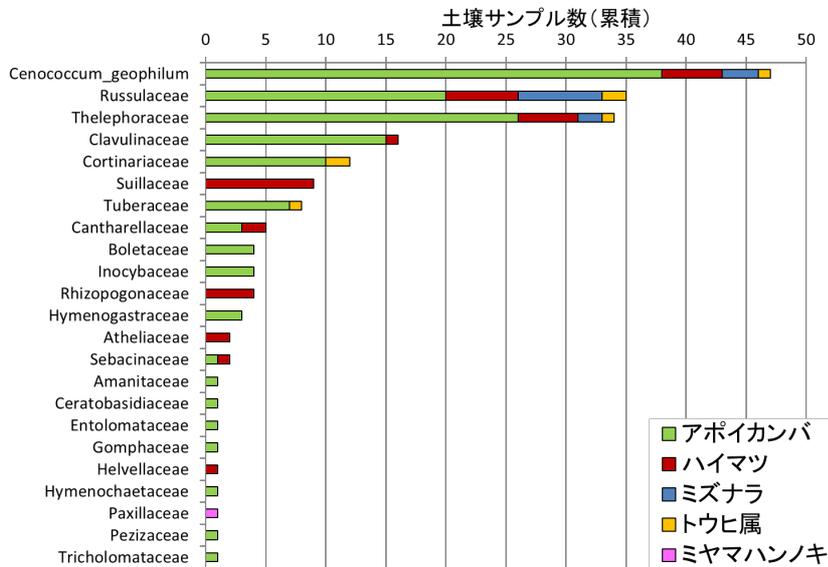


図1 検出された成木の菌根菌の出現頻度 (科レベル)

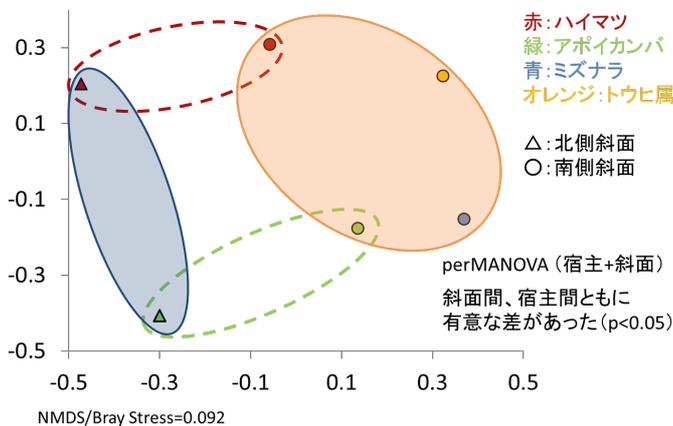


図2 斜面および宿主における菌根菌群集のNMDS解析

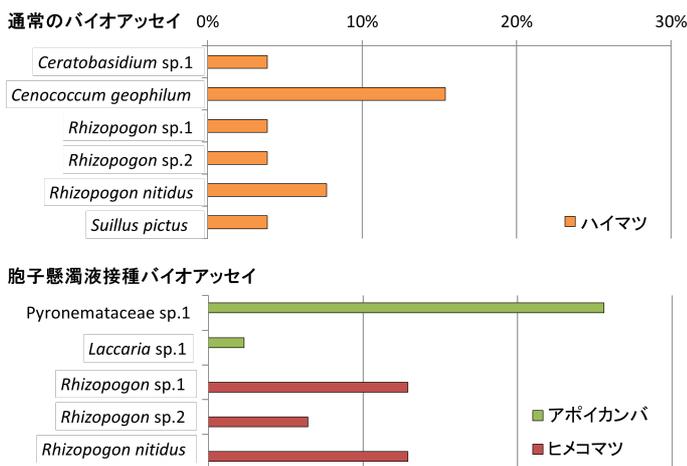


図3 バイオアッセイで検出された菌根菌の出現頻度

イマツの浸食が進み、アポイカンバの個体数がさらに減少するとアポイカンバの更新できる環境もなくなり、より衰退を進める結果となってしまふ可能性がある。

<引用文献>

村田政穂・奈良一秀 (2017) 絶滅危惧種トガサワラの優占林分における土壌深度別の外生菌根菌群集. 日本森林学会誌 99: 195-201.

Murata, M., Kinoshita, A., Nara, K. (2013) Revisiting the host effect on ectomycorrhizal fungal communities: implications from host-fungal associations in relict *Pseudotsuga japonica* forests. Mycorrhiza 23: 641-653.

Murata, M., Kanetani, S., Nara, K. (2017a) Ectomycorrhizal fungal communities in endangered *Pinus amamiana* forests. PlosOne 12(12): e0189957.

Murata, M., Nagata, Y., Nara, K. (2017b) Soil spore banks of ectomycorrhizal fungi in endangered Japanese Douglas-fir forests. Ecological Research 32: 469-479.

Nara, K., Hogetsu, T. (2004) Ectomycorrhizal fungi on established shrubs facilitate subsequent seedling establishment of successional plant species. Ecology 85: 1700-1707.

Tedersoo, L., Jairus, T., Horton, B.M., Abarenkov, K., Suvi, T., Saar, I., Koljalg, U. (2008) Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. New Phytologist 180:479-490.

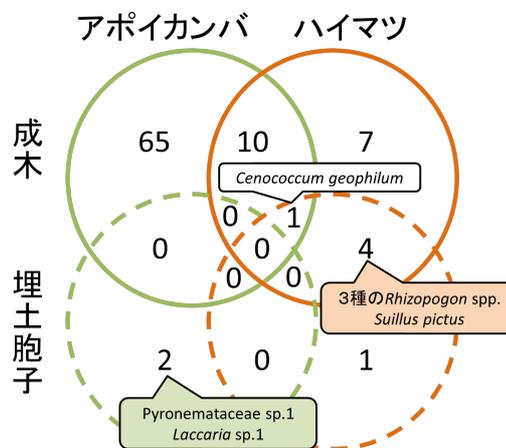


図4 成木と埋土孢子の菌根菌種数

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

(計 2 件)

村田政穂・奈良一秀 アポイカンバ・ハイマツ林における外生菌根菌の埋土孢子群集 . 第 130 回日本森林学会大会(朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市), 2019 年 3 月 21 日)

村田政穂・奈良一秀 アポイカンバ・ハイマツ林の外生菌根菌群集 . 第 128 回日本森林学会大会 (鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市), 2017 年 3 月 28 日)

[その他]

シンポジウムなどでの講演

アポイカンバを絶滅から救う? 菌根菌の探索 . ぷるさとジオ塾特別版「植物ときのこ」(北海道・様似町アポイ岳ジオパーク推進協議会 , 2017 年 10 月)

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。